

中華民國經濟部智慧財產局

INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE  
MINISTRY OF ECONOMIC AFFAIRS  
REPUBLIC OF CHINA

茲證明所附文件，係本局存檔中原申請案的副本，正確無訛，  
其申請資料如下：

This is to certify that annexed is a true copy from the records of this  
office of the application as originally filed which is identified hereunder：

申 請 日：西元 2003 年 11 月 20 日  
Application Date

申 請 案 號：092132541  
Application No.

申 請 人：財團法人台灣動物科技研究所  
Applicant(s)

局 長  
Director General

蔡 練 生

發文日期：西元 2004 年 2 月 11 日  
Issue Date

發文字號：09320127110  
Serial No.

# 發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：

※ 申請日期：

※IPC 分類：

壹、發明名稱：(中文/英文)

於非人類之基因轉殖哺乳動物乳汁中表現多種外源蛋白質之方法

貳、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

財團法人台灣動物科技研究所

代表人：(中文/英文)(簽章) 翁仲男

住居所或營業所地址：(中文/英文)

苗栗縣竹南鎮科東二路 52 號

國 籍：(中文/英文) 中華民國/R.O.C.

電話/傳真/手機：

E-MAIL：

參、發明人：(共 6 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 吳 信 志

2. 鄭 登 貴

3. 陳 全 木

4. 林 劭 品

5. 顏 重 河

6. 楊 平 政

住居所地址：(中文/英文)

1. 苗栗縣竹南鎮頂埔里 15 鄰中華路 137 巷 8 弄 8-2 號 10 樓

2. 台北市基隆路 3 段 155 巷 50 號
3. 台中市南區 402 仁義街 72-8 號 3 樓之 1
4. 台北市大安區和安里 10 鄰信義路 3 段 147 巷 15 弄 3 號 6 樓
5. 台中市篤行路 63 號
6. 新竹市北區舊社里 1 鄰涵雅街 212-2 號 7 樓

國 籍：(中文/英文)

1.2.3.4.5.6.7.8.中華民國/R.O.C.

#### 肆、聲明事項：

☐ 本案係符合專利法第二十條第一項☐第一款但書或☐第二款但書規定之期間，

其日期為： 年 月 日。

◎本案申請前已向下列國家（地區）申請專利 ☐ 主張國際優先權：

【格式請依：受理國家（地區）；申請日；申請案號數 順序註記】

1.

2.

3.

4.

5.

☐ 主張國內優先權(專利法第二十五條之一)：

【格式請依：申請日；申請案號數 順序註記】

1.

2.

☐ 主張專利法第二十六條微生物：

☐ 國內微生物 【格式請依：寄存機構；日期；號碼 順序註記】

☐ 國外微生物 【格式請依：寄存國名；機構；日期；號碼 順序註記】

☐ 熟習該項技術者易於獲得，不須寄存。

#### 伍、中文發明摘要：

本發明係關於一種於非人類之基因轉殖哺乳動物乳汁中表現多種外源蛋白質之方法，主要係將人類第九凝血因子基因與豬乳鐵蛋白基因，利用基因注入及胚移植方式轉殖至哺乳動物，使其於該基因轉殖哺乳動物及其子代之乳汁中表現。本發明之方法係可於基因轉殖哺乳動物泌乳期間維持多種外源蛋白質的穩定表現，並且於基因轉殖哺乳動物子代亦可維持與近似第一代之穩定表現量。

#### 陸、英文發明摘要：

柒、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第（ 三 ）圖。

(二)本代表圖之元件代表符號簡單說明：

無

捌、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無

## 玖、發明說明：

### 【發明所屬之技術領域】

本發明係關於一種於非人類之基因轉殖哺乳動物乳汁中表現多種外源蛋白質之方法，主要係將攜帶有包括人類第九凝血因子基因與豬乳鐵蛋白基因等多種外源蛋白質基因之表現載體，利用基因注入及胚移植方式轉殖至哺乳動物，使該多種外源蛋白質可於基因轉殖哺乳動物及其子代之乳汁中表現。

### 【先前技術】

在臨床醫學之報告中不乏因先天性遺傳基因之缺陷，導致體內無法合成具生物活性之蛋白質。針對此等疾病之治療，通常係以外源蛋白質逕行補充方式為之。人類第九凝血因子(human clotting factor IX, hFIX)係為分子量 55 kDa 之單鏈醣蛋白質，該蛋白質係於肝臟中被合成，經轉譯修飾後再分泌至血流中。在正常人血漿中之人類第九凝血因子含量約 5 $\mu$ g / ml；惟 B 型血友病(hemophilia B)患者之血漿中，則因缺乏人類第九凝血因子，遂導致凝血功能之異常。已知人類第九凝血因子之基因係位於 X 染色體之長臂中，因此 B 型血友病係屬於性聯遺傳之疾病，以男性患者為主，其平均發生率為 1/30,000 (Thompson, 1986)。目前 B 型血友病之患者所使用之第九凝血因子一般均源自人類血漿所純化者，其中存在疾病感染(如肝炎、AIDS)之風險，若能將第九凝血因子之基因，與組織專一性表現之調節序列進行構築，如與 $\alpha$ -乳白蛋白調節序列構築成轉殖基因，再應用基因轉殖技術，產生攜有轉殖基因之動物，則可望

在乳汁中回收大量具生物活性，且不受病毒威脅之第九凝血因子。藉由基因轉殖家畜之乳腺進行量產，則對於 B 型血友病患者，將是一大助俾。

重組人類第九凝血因子 cDNA 首次被表現於基因轉殖小鼠之肝臟(Choo *et al.*, 1987)。應用重組之人類第九凝血因子進行基因轉殖所產生之基因轉殖小鼠，已被證明可在其肝臟中表現該外源基因產物，且經肝臟分泌進入血液中之人類第九凝血因子，濃度甚至高達正常人血漿中者 7 倍 (Jallat *et al.*, 1990)；此等試驗結果亦發現當重組人類第九凝血因子基因保留有介入子序列時，可顯著提高轉殖基因之表現效率。此外，Clark *et al.*(1989)曾藉由 $\beta$ -lactoglobulin(BLG)啟動子與人類第九凝血因子 cDNA 構築形成乳腺專一表現之重組基因，提供進行綿羊之基因轉殖，結果證明其產生之基因轉殖綿羊，確可於乳腺中表現具生物活性之人類第九凝血因子基因轉殖產物，惟其表現量僅及 25ng / ml 。Van Cott *et al.*(1999)曾將小鼠乳清酸蛋白啟動子構築於人類第九凝血因子之結構基因上，並將重組基因轉殖於豬之染色體中，結果證明該殖入之基因在轉殖豬乳腺中之表現量確可高達 0.2 mg/ ml，惟在泌乳中期即中止表現人類第九凝血因子。上述結果顯示，以基因轉殖家畜之乳腺量產重組人類第九凝血因子之研發，誠然具有商業生產價值，然而其仍有許多問題待克服，例如：重組人類第九凝血因子於基因轉殖家畜乳汁中之表現量、其表現的時間仍無法持續至泌乳期結束後仍繼續表現、以及將人類第九凝血因子與其他具有加成作用的基因共同轉殖至豬隻體內，在取得目標蛋白質人類第九凝血因子之時也同時增進豬隻健康等，仍是目前努力研究以其有所突破之目標。

【發明內容】



有鑒於習知於基因轉殖動物之乳汁中表現人類第九凝血因子方法之缺失，本發明係提供一種於非人類之基因轉殖哺乳動物乳汁中持續表現多種外源蛋白質之方法，其步驟係包括：(a) 構築含有多種外源蛋白質基因且能表現於哺乳動物乳腺之表現質體；(b) 將前述多種外源蛋白質基因之表現質體進行基因注入及胚移植至一非人類之哺乳動物，使前述多種外源蛋白質表現於該基因轉殖哺乳動物之乳汁中，且於泌乳期間可持續表現。

其中前述之步驟(a)係可選擇將多種外源蛋白質基因構築於同一表現質體上或將多種外源蛋白質基因分別構築於不同的表現質體之方式；若選擇將多種外源蛋白質基因分別構築於不同的表現質體，則需於步驟(a)與(b)之間進一步加入一混合不同表現載體之步驟。

前述含有多種外源蛋白質基因表現載體之構築係包括：5'調控序列，其具有乳腺表現專一性，並可調控外源蛋白質基因使其於基因轉殖哺乳動物之泌乳期間持續穩定表現；以及外源蛋白質基因，係位於5'調控序列之後並可接受其調控而表現。

前述之5'調控序列係為牛 $\alpha$ 乳白蛋白啟動子。

前述轉殖之多種外源蛋白質基因係可藉由有性生殖而遺傳給子代。

前述之多種外源蛋白質基因係可包括人類第九凝血因子基因與乳鐵蛋白基因，且用於轉殖哺乳動物之含有人類第九凝血因子基因之表現載體與含有乳鐵蛋白基因之表現載體，其混合比例係為1：1。

前述之基因轉殖哺乳動物之乳汁表現之人類第九凝血因子之濃度係可達到 200-500  $\mu\text{g/mL}$ ，且經純化後活性至少可達到人類血漿之90%。

前述利用本發明之方法所製得之基因轉殖哺乳動物係可於

泌乳期間持續穩定表現外源蛋白質。前述之基因轉殖哺乳動物係為牛、羊或豬，較佳係為豬。

前述於非人類之基因轉殖哺乳動物乳汁中持續表現多種外源蛋白質之方法，其係可進一步於步驟(b)之後加入步驟：

(c)收集前述含有多種外源蛋白質之乳汁；以及

(d)由前述乳汁中分離出前述多種外源蛋白質，

以便自基因轉殖哺乳動物乳汁中取得前述多種外源蛋白質。

本發明之另一目的係提供一種於非人類之基因轉殖哺乳動物乳汁中持續表現人類第九凝血因子與豬乳鐵蛋白之方法，其步驟係包括：(a) 構築含有人類第九凝血因子基因與豬乳鐵蛋白基因且能表現於哺乳動物乳腺之表現質體；(b) 將前述人類第九凝血因子基因與豬乳鐵蛋白基因之表現質體進行基因注入及胚移植至一非人類之哺乳動物，使前述人類第九凝血因子與豬乳鐵蛋白表現於該基因轉殖哺乳動物之乳汁中，且於泌乳期間可持續表現。

其中前述之步驟(a)係可將人類第九凝血因子基因與豬乳鐵蛋白基因構築於同一表現質體上或將人類第九凝血因子基因與豬乳鐵蛋白基因分別構築於不同的表現質體，但若選擇分別構築於不同的表現質體，則需於步驟(a)與(b)之間進一步加入一混合不同表現載體之步驟，其混合比例為 1：1。

前述含有人類第九凝血因子基因及/或豬乳鐵蛋白基因表現載體之構築係至少包括：5'調控序列，係具有乳腺表現專一性，並可調控人類第九凝血因子基因及/或豬乳鐵蛋白基因使其於基因轉殖哺乳動物之泌乳期間持續穩定表現；以及人類第九凝血因子基因及/或豬乳鐵蛋白基因，係位於 5'調控序列之後並可接受其調控而表現。

前述之 5'調控序列係為牛  $\alpha$  乳白蛋白啟動子。

前述轉殖之人類第九凝血因子基因與豬乳鐵蛋白基因係可藉由有性生殖而遺傳給子代。

前述之基因轉殖哺乳動物之乳汁表現之人類第九凝血因子之濃度係可達到 200-500  $\mu\text{g/mL}$ ，且經純化後活性至少可達到人類血漿之 90%。

前述利用本發明之方法所製得之基因轉殖哺乳動物係可於泌乳期間持續穩定表現外源蛋白質。前述之基因轉殖哺乳動物係為牛、羊或豬，較佳係為豬。

前述於非人類之基因轉殖哺乳動物乳汁中持續表現人類第九凝血因子與豬乳鐵蛋白之方法，其係可進一步於步驟(b)之後加入步驟：

(c)收集前述含有人類第九凝血因子與豬乳鐵蛋白之乳汁；以及

(d)由前述乳汁中分離出前述人類第九凝血因子與豬乳鐵蛋白，

以便自基因轉殖哺乳動物乳汁中取得人類第九凝血因子與豬乳鐵蛋白。

## 【實施方式】

本發明提供下列實施例進一步說明本發明，該實施例係為了進一步闡述本發明，而非作為本發明之限制。

本發明係提供一種於非人類之基因轉殖哺乳動物乳汁中表現多種外源蛋白質之方法，係可用以製備攜帶人類第九凝血因子基因以及外源性豬乳鐵蛋白基因之雙基因轉殖豬。該雙基因轉殖豬分泌的乳汁中不僅可表現人類第九凝血因子(human clotting factor IX, hFIX)，並含有外源性豬乳鐵蛋白，主要係可以幫助仔豬的增強免疫力與抵抗力，減少仔豬下痢的情形，以及抗發炎

的功效。此外源性豬乳鐵蛋白與內源性豬乳鐵蛋白的不同之處在於，轉殖的外源性豬乳鐵蛋白係可於哺乳期間持續而穩定的分泌，然而內源性的豬乳鐵蛋白則會隨著泌乳期間的延長而降低表現。

實施例一、製備攜帶有外源豬乳鐵蛋白基因及人類第九凝血因子基因轉殖豬

本發明之轉殖方式係將豬乳鐵蛋白基因 (porcine lactferrin, pLF) 及人類第九凝血因子基因分別與牛  $\alpha$  乳白蛋白啟動子 (bovine  $\alpha$  lactalbumin promoter,  $\alpha$  LA) 構築成表現質體，將等濃度之兩種前述表現質體相互以 1:1 之比例混合後利用顯微注射將混合後兩種表現質體一起注入，再進行胚移置，以此方法共獲得二系攜雙基因之轉殖豬。收集該雙基因轉殖母豬泌乳期間的乳汁備用，以進行外源蛋白質表現之定量及定性分析。

實施例二、分析第一代基因轉殖豬之乳汁中外源蛋白質的表現

將稀釋 20 倍的乳汁經過聚丙稀醯胺膠體電泳分離法 (SDS-PAGE) 分離及 Coomassie blue 染色，將該電泳膠片上的蛋白質轉移到纖維膜上進行西方轉漬實驗，利用專一性抗體檢測人類第九凝血因子，實驗結果如第一圖所示，顯示整個泌乳期人類第九凝血因子之表現量維持穩定之狀態。

為確認第一代基因轉殖豬乳汁中的人類第九凝血因子與豬乳鐵蛋白的表現，實驗步驟同上，將稀釋 20 倍的乳汁經過聚丙稀醯胺膠體電泳分離法 (SDS-PAGE) 分離及 Coomassie blue 染色，將該電泳膠片上的蛋白質轉移到纖維膜上進行西方轉漬實驗，利用專一性抗體檢測人類第九凝血因子與豬乳鐵蛋白的量。實驗結果係如第二圖所示，顯示整個泌乳期人類第九凝血因子與

豬乳鐵蛋白之表現量維持穩定之狀態，其中人類第九凝血因子的標準樣品量為 50ng，而豬乳鐵蛋白的標準樣品量為 100ng，另外負控制組則表示萃取自非基因轉殖豬之乳汁作為比較。

實施例三、觀察子代基因轉殖豬之乳汁中人類第九凝血因子的表現

為確認子代基因轉殖豬乳汁中的人類第九凝血因子之表現，分別收集第二代、第三代與第四代基因轉殖豬之乳汁，利用同於前述的實施例之步驟進行西方轉漬法，再利用專一性之抗體檢測，結果係如第三圖所示，發現子代之基因轉殖豬仍可於乳汁中表現人類第九凝血因子，且其表現不會隨著泌乳期間的天數而下降。

實施例四、比較基因轉殖豬與非基因轉殖豬之乳汁中豬乳鐵蛋白表現量之差異

收集泌乳期間之基因轉殖豬與對照組豬隻(未進行基因轉殖母豬)之乳汁，比較其豬乳鐵蛋白在整個泌乳期表現量，結果係如第四圖所示，對照組的乳汁中豬乳鐵蛋白在泌乳期第十天之後量就變的非常低，而攜帶有外源豬乳鐵蛋白基因之基因轉殖豬，其豬乳鐵蛋白的表現量較其對照組來的高且穩定。而且經過評估試驗發現，基因轉殖母豬之仔豬育成率較對照組(未進行基因轉殖母豬)提高了 10%，顯示豬乳鐵蛋白的持久表現對於仔豬的育成有相當的助益。

實施例五、基因轉殖豬之乳汁中人類第九凝血因子之活性測試

所收集的每毫升豬乳中含有之人類第九凝血因子濃度約 200~500  $\mu\text{g}$ ，為正常人血漿中所含有第九凝血因子濃度(5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )之 40-100 倍，且在整個 28 天泌乳期之表現量維持穩定之狀態。利用 APTT 方法分析全乳之凝血活性約為人類血漿之  $14.18 \pm$

1.45(參見表一)，且經純化者之活性至少可達人類血漿之 90%(參見第五圖)，

表一

人類第九凝血因子來源	動物頭數	乳汁中人類第九凝血因子之濃度( $\mu\text{g/ml}$ )	凝血活性%
基因轉殖豬(全乳)	16	$408.34 \pm 55.0$	$14.18 \pm 2.45$
對照組(全乳)	3	0	0

本發明之方法係可成功地將兩種甚至以上的外源基因轉殖到豬隻體內，且於母豬哺乳期間，所轉殖的基因均可持續而穩定的大量表現蛋白質，相較於前述習知轉殖技術於哺乳期間第十一天之後即大量減少甚至終止表現外源蛋白質的情形，本發明有相當的進步性，再者，本發明技術所轉殖的哺乳動物，其產下的子代亦均攜帶有轉殖的外源基因，且其表現量均不亞於接受轉殖技術的第一代，更進一步突顯本發明的優勢。

任何熟悉此技藝者，在不脫離本發明之精神和範圍內，當可作各種之更動與潤飾，因此，本發明之保護範圍，當視後附之申請專利範圍所界定者為準。

### 【圖式簡單說明】

第一圖係顯示本發明之第一代基因轉殖豬於泌乳期間人類第九凝血因子之表現量。

第二圖係顯示本發明之第一代基因轉殖豬於泌乳期間人類第九凝血因子與豬乳鐵蛋白之表現量。

第三圖係顯示本發明之基因轉殖豬之子代於泌乳期間人類第九凝血因子之表現量。

第四圖係顯示本發明之基因轉殖豬與非基因轉殖豬之乳汁中豬乳鐵蛋白表現量之差異。

第五圖係顯示本發明之基因轉殖豬之乳汁中人類第九凝血因子之活性。

### 【主要元件符號】

無

## 拾、申請專利範圍：

1. 一種於非人類之基因轉殖哺乳動物乳汁中持續表現多種外源蛋白質之方法，其步驟係包括：

(a) 構築含有多種外源蛋白質基因且能表現於哺乳動物乳腺之表現質體；及

(b) 將前述多種外源蛋白質基因之表現質體進行基因注入及胚移植至一非人類之哺乳動物，使前述多種外源蛋白質表現於該基因轉殖哺乳動物之乳汁中，且於泌乳期間可持續表現。

2. 如申請專利範圍第 1 項所述於非人類之基因轉殖哺乳動物乳汁中持續表現多種外源蛋白質之方法，其中步驟(a)係可將多種外源蛋白質基因構築於同一表現質體上或將多種外源蛋白質基因分別構築於不同的表現質體。

3. 如申請專利範圍第 1 項所述於非人類之基因轉殖哺乳動物乳汁中持續表現多種外源蛋白質之方法，若將多種外源蛋白質基因分別構築於不同的表現質體，則於步驟(a)與(b)之間進一步加入一混合不同表現載體之步驟。

4. 如申請專利範圍第 1 項所述於非人類之基因轉殖哺乳動物乳汁中持續表現多種外源蛋白質之方法，其中前述含有多種外源蛋白質基因表現載體之構築係包括：

5'調控序列，係具有乳腺表現專一性，並可調控外源蛋白質基因使其於基因轉殖哺乳動物之泌乳期間持續穩定表現；以及

外源蛋白質基因，係位於 5'調控序列之後並可接受其調控而表現。

5. 如申請專利範圍第 1 項所述於非人類之基因轉殖哺乳動物乳汁中持續表現多種外源蛋白質之方法，其中前述轉殖之多種外源蛋白質基因係可藉由有性生殖而遺傳給子代。

6. 如申請專利範圍第 1 項所述於非人類之基因轉殖哺乳動物乳



汁中持續表現多種外源蛋白質之方法，其中前述之多種外源蛋白質基因係包括人類第九凝血因子基因與乳鐵蛋白基因。

7. 如申請專利範圍第 6 項所述於非人類之基因轉殖哺乳動物乳汁中持續表現多種外源蛋白質之方法，其中前述含有人類第九凝血因子基因之表現載體與含有乳鐵蛋白基因之表現載體其混合比例係為 1 : 1。

8. 如申請專利範圍第 4 項所述於非人類之基因轉殖哺乳動物乳汁中持續表現多種外源蛋白質之方法，其中前述之 5' 調控序列係為牛  $\alpha$  乳白蛋白啟動子。

9. 如申請專利範圍第 1 項所述於非人類之基因轉殖哺乳動物乳汁中持續表現多種外源蛋白質之方法，其中前述之基因轉殖哺乳動物之乳汁表現之人類第九凝血因子之濃度係可達到 200-500  $\mu$ g/mL，且經純化後活性至少可達到人類血漿之 90%。

10. 如申請專利範圍第 1 項所述於非人類之基因轉殖哺乳動物乳汁中持續表現多種外源蛋白質之方法，其中前述之基因轉殖哺乳動物係可於泌乳期間持續穩定表現外源蛋白質。

11. 如申請專利範圍第 1 項所述於非人類之基因轉殖哺乳動物乳汁中持續表現多種外源蛋白質之方法，其中前述之基因轉殖哺乳動物係為牛、羊或豬。

12. 如申請專利範圍第 11 項所述於非人類之基因轉殖哺乳動物乳汁中持續表現多種外源蛋白質之方法，其中前述之基因轉殖哺乳動物係為豬。

13. 如申請專利範圍第 1 項所述於非人類之基因轉殖哺乳動物乳汁中持續表現多種外源蛋白質之方法，其係可進一步於步驟(b)之後加入步驟：

(c)收集前述含有多種外源蛋白質之乳汁；以及

(d)由前述乳汁中分離出前述多種外源蛋白質，

以便自基因轉殖哺乳動物乳汁中取得前述多種外源蛋白質。

14. 一種於非人類之基因轉殖哺乳動物乳汁中持續表現人類第九凝血因子與豬乳鐵蛋白之方法，其步驟係包括：

(a) 構築含有人類第九凝血因子基因與豬乳鐵蛋白基因，且能表現於哺乳動物乳腺之表現質體；及

(b) 將前述含有人類第九凝血因子基因與豬乳鐵蛋白基因之表現質體進行基因注入及胚移植至一非人類之哺乳動物，且使前述人類第九凝血因子與豬乳鐵蛋白表現於該基因轉殖哺乳動物之乳汁中且於泌乳期間可持續表現。

15. 如申請專利範圍第 14 項所述於非人類之基因轉殖哺乳動物乳汁中持續表現人類第九凝血因子與豬乳鐵蛋白之方法，其中步驟(a)係可將人類第九凝血因子基因與豬乳鐵蛋白基因構築於同一表現質體上或將人類第九凝血因子基因與豬乳鐵蛋白基因分別構築於不同的表現質體。

16. 如申請專利範圍第 15 項所述於非人類之基因轉殖哺乳動物乳汁中持續表現人類第九凝血因子與豬乳鐵蛋白之方法，若將人類第九凝血因子基因與豬乳鐵蛋白基因分別構築於不同的表現質體，則於步驟(a)與(b)之間進一步加入一混合含人類第九凝血因子之表現載體與含豬乳鐵蛋白基因之表現載體之步驟。

17. 如申請專利範圍第 16 項所述於非人類之基因轉殖哺乳動物乳汁中持續表現人類第九凝血因子與豬乳鐵蛋白之方法，其中前述含人類第九凝血因子之表現載體與含豬乳鐵蛋白基因之表現載體之混合比例係為 1:1。

18. 如申請專利範圍第 14 項所述於非人類之基因轉殖哺乳動物乳汁中持續表現人類第九凝血因子與豬乳鐵蛋白之方法，其中前述含有第九凝血因子基因及/或含豬乳鐵蛋白基因之表現載體之構築係包括：

5'調控序列，係具有乳腺表現專一性，並可調控其後的基因使其於基因轉殖哺乳動物之泌乳期間持續穩定表現；以及第九凝血因子基因及/或含豬乳鐵蛋白基因，係位於 5'調控序列之後並可接受其調控而表現。

19. 如申請專利範圍第 18 項所述於非人類之基因轉殖哺乳動物乳汁中持續表現人類第九凝血因子與豬乳鐵蛋白之方法，其中前述之 5'調控序列係為牛  $\alpha$  乳白蛋白啟動子。

20. 如申請專利範圍第 14 項所述於非人類之基因轉殖哺乳動物乳汁中表現人類第九凝血因子與豬乳鐵蛋白之方法，其中前述轉殖之人類第九凝血因子基因與豬乳鐵蛋白基因係可藉由有性生殖而遺傳給子代。

21. 如申請專利範圍第 14 項所述於非人類之基因轉殖哺乳動物乳汁中表現兩種人類第九凝血因子與豬乳鐵蛋白之方法，其中前述之基因轉殖哺乳動物之乳汁表現之人類第九凝血因子之濃度係可達到 200-500  $\mu\text{g/mL}$ ，且經純化後活性至少可達到人類血漿之 90%。

22. 如申請專利範圍第 14 項所述於非人類之基因轉殖哺乳動物乳汁中表現人類第九凝血因子與豬乳鐵蛋白之方法，其中前述之基因轉殖哺乳動物係可於泌乳期間持續穩定表現外源蛋白質。

23. 如申請專利範圍第 14 項所述於非人類之基因轉殖哺乳動物乳汁中表現人類第九凝血因子與豬乳鐵蛋白之方法，其中前述之基因轉殖哺乳動物係為牛、羊或豬。

24. 如申請專利範圍第 23 項所述於非人類之基因轉殖哺乳動物乳汁中表現人類第九凝血因子與豬乳鐵蛋白之方法，其中前述之基因轉殖哺乳動物係為豬。

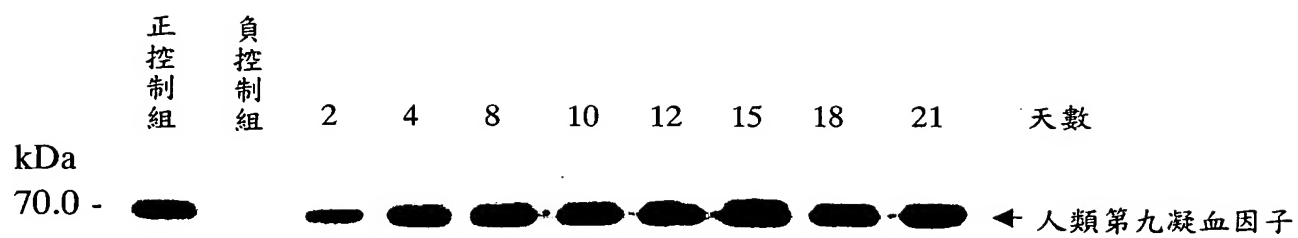
25. 如申請專利範圍第 14 項所述於非人類之基因轉殖哺乳動物乳汁中持續表現人類第九凝血因子與豬乳鐵蛋白之方法，其係可

進一步於步驟(b)之後加入步驟：

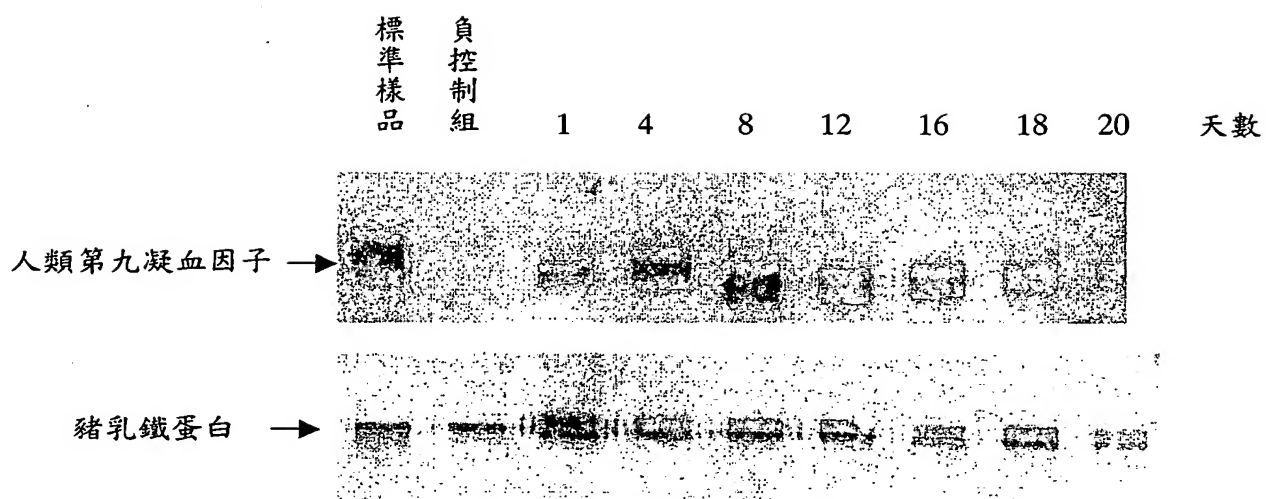
(c)收集前述含有人類第九凝血因子與豬乳鐵蛋白之乳汁；  
以及

(d)由前述乳汁中分離出前述人類第九凝血因子與豬乳鐵蛋白，

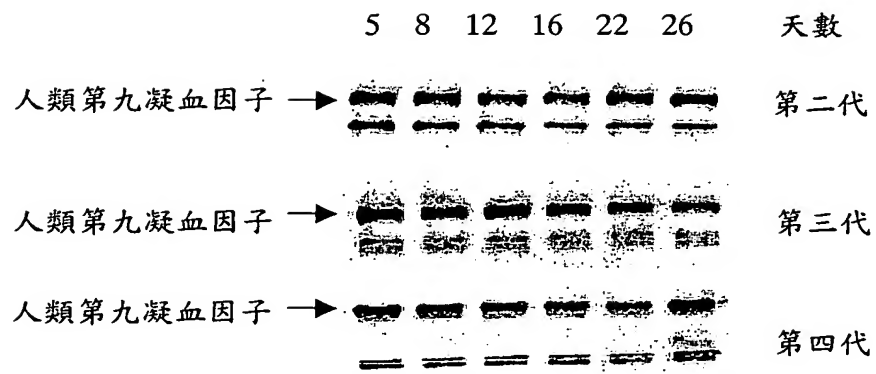
以便自基因轉殖哺乳動物乳汁中取得人類第九凝血因子與豬乳鐵蛋白。



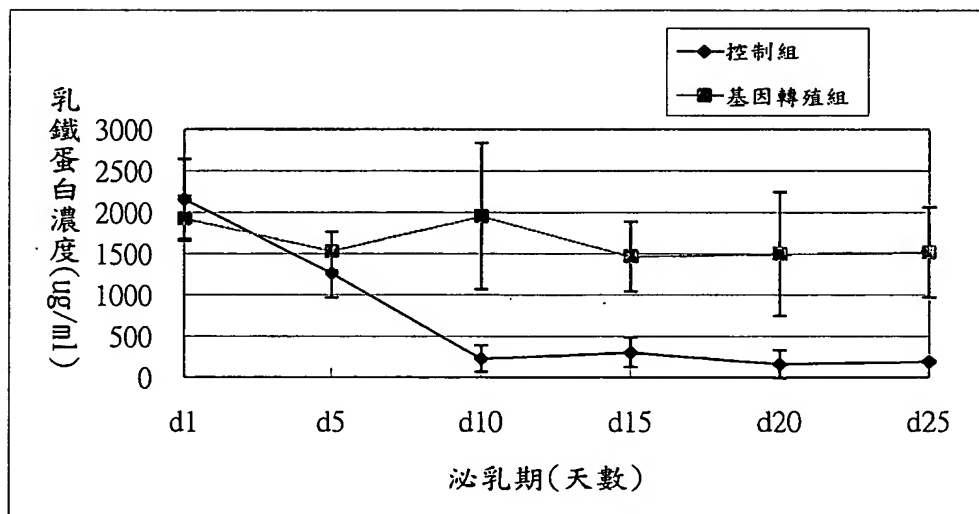
第一圖



第二圖

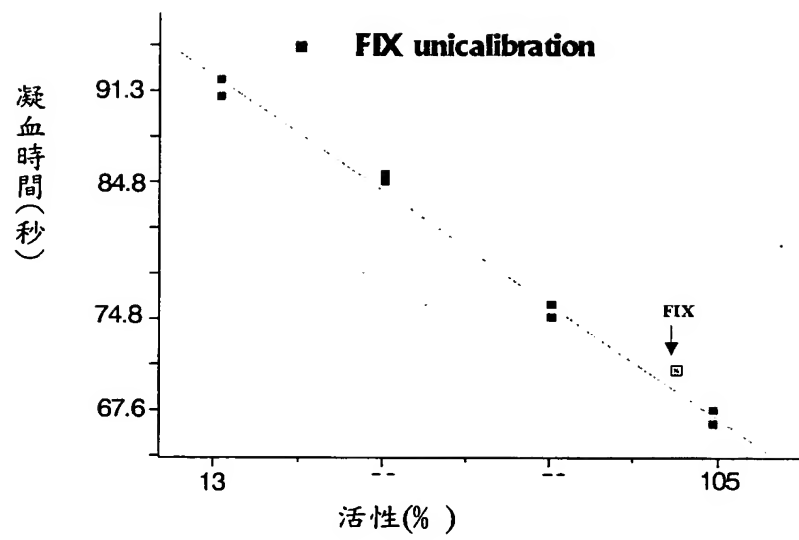


第三圖



第四圖





第五圖